

# ALBIHNS

## Patent- och Registreringsverket

### Stockholm

#### NY ANSÖKAN OM SVENSKT PATENT

Handlägges av: Mikael G:son Bergstrand

Vår ref: 50712

19980402 2 86277 270 980197  
19980402 2 86278 271 980197  
19980402 2 86279 272 980197  
19980402 2 86280 273 980197  
19980402 2 86281 274 980197

UPPFINNINGENS BENÄMNING	New agent
SÖKANDE (namn och adress)	Essum AB Glimmervägen 5 E 907 40 UMEÅ
UPPFINNARE (namn och adress)	Se bilaga.
BEGÄRAN OM PRIORITET (datum, land och ansökningsnr.)	1998-03-06, SE 9800749-5
VID DEPOSITION AV MIKROORGANISM	Depositionsmyndighet Depositionsnummer
VID AVDELAD ELLER UTBRUTEN ANSÖKNING	Stamansökningsnummer Begärd löpdag

#### BILAGOR

- x Beskrivning, patentkrav och sammandrag i 2 exemplar (avser fig. 1)
- x 4 ritningar i 2 exemplar
- Överlåtelsehandling
- Fullmakt
- Utländsk text,
- Prioritetsbevis
- x Förteckning över uppfinnarnas namn- och adresser

Stockholm den 2 juni 1998

*Anne Paulsen*

ALBIHNS PATENTBYRÅ STOCKHOLM AB

#### AVGIFT

- x Grundavgift 3 800:-
- x Tilläggsavgift 100:- för patentkrav över 10
- x Grundavgift 3 200:- för ITS-granskning

## **Patent- och Registreringsverket**

### **Stockholm**

**BILAGA TILL NY ANSÖKAN OM SVENSKT PATENT**

Handlägges av: Mikael G:son Bergstrand

Vår ref: 50712

### **Förteckning över uppfinnarnas namn- och adresser:**

Eva Grahns Håkansson	Nygatan 74 903 31 UMEÅ
Ulla Forsgren-Brusk	Plommonvägen 35 435 43 MÖLNLYCKE
Rolf Andersson	Vallmovägen 11 435 31 MÖLNLYCKE
Stig E. Holm	Norra Gimonäsvägen 25 907 38 UMEÅ
Stellan Håkansson	Nygatan 74 903 31 UMEÅ

## Patent- och Registreringsverket

### Stockholm

*P ans nr* 9801951-6  
*Rotel* 321  
*Vår handläggare* Mikael G:son Bergstrand  
*Vår ref* 50712  
*Sökande* Essum AB

Med anledning av föreläggandet av 6 november 1998 inlämnas härmed en svensk bestyrkt översättning av beskrivning patentkrav och sammandrag. För att styrka reproducerbarhet, allmän tillgänglighet och för att uppfylla kraven i PL 8a§ och PK 17a§ inlämnas vidare ett intyg om att deponering av den patentsökta stammen skett i enlighet med Budapest-överenskommelsen. Sökanden önskar även lämna följande kommentarer:

Granskaren anför US 5 705 160 (D1), WO 97/29762 (D2), WO 84/04675 (D3) och WO 93/09793 (D4) vilka alla beskriver användning av stammar av *Lactobacillus plantarum* för att behandla/förebygga urogenitala infektioner. Granskaren ifrågasätter därefter om den nya deponerade stammen DSM11918 uppvisar några nya och oväntade egenskaper i förhållande till de förut kända stammarna.

Sökanden menar att sådana nya och oväntade egenskaper klart framgår ur ansökan. Den nya stammen uppvisar en oväntat kraftig förmåga att inhibera tillväxt av bakterier av släktena *Staphylococcus*, *Streptococcus* type B, *Klebsiella*, *Escherichia coli* och *Proteus*. Staphylokokker inhiberas till 90 % och övriga ovan nämnda slakten inhiberas fullständigt. Däremot inhiberas andra *Lactobacillus*-arter endast obetydligt. Detta framgår ur tabell I på sidan 8 i den översatta beskrivningen. Exempel 3 visar att den nya stammen uppvisar en mycket god överlevnadsförmåga under många olika förhållanden. Exempel 4, 5 och 7 visar att stammen har en god vidhäftningsförmåga i perineum och till vaginala epitelceller, samt att den kan överföras från en absorberande artikel till användarens hud. Slutligen visar exempel 6 att den deponerade nya stammen är resistent mot flera antibiotikasubstanser samt

det spermacidala medlet Tergitol NP-9. En sådan resistens är viktig eftersom den gör det möjligt att biologiskt förebygga bakterieinfektioner i perineum samtidigt med annan behandling.

De flesta av de anförda dokumenten saknar redogörelser för inhibering av bakterietillväxt, överlevnadsförmåga i olika miljöer, förmåga till överföring samt resistens mot antibiotika substanser. Några av dokumenten ger en del sådan information men resultaten är sämre jämfört med resultaten för sökandens deponerade stam. D1 hänför sig till en komposition för behandling av urinvägsinfektioner innehållande olika *Lactobacillus*-stammar.

*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 omnämns, men anmärkningsvärt nog ingår den inte någon komposition enligt patentkraven. Tabell 6 i D1 redogör för försök avseende inhibering av tillväxt av patogena bakterier. Det framgår att sökandens deponerade stam uppvisar bättre inhiberingsegenskaper än alla stammarna i tabell 6. Som redan nämnts inhiberar sökandens stam så gott som fullständigt tillväxt av bakterier av släktena *Staphylococcus*, *Streptococcus* type B, *Klebsiella*, *Escherichia coli* och *Proteus*. Den enda stam i tabell 6 som helt inhiberar *Klebsiella*, *L. jensenii*, inhiberar inte alla *Proteus* och inhiberar endast i begränsad omfattning *E. coli*. *L. plantarum* ATCC 8014 inhiberar bara *Proteus* och *Staphylococcus*. D1 nämner ingenting om överlevnadsförmågan, vidhäftningsförmågan till hud eller antibiotikaresistens hos de olika bakteriestammarna som diskuteras.

D2 behandlar kompositioner för behandling och förebyggande av urogenitala sjukdomar och tarmsjukdomar som innehåller en anti-vidhäftande mängd av en viss växt eller ett extrakt av denna, i kombination med exempelvis *Lactobacillus*. Med andra ord, D2 är inte inriktad mot bakterier i sig. Således finns ingen redogörelse för försök vad gäller inhibering av bakterietillväxt, överlevnadsförmåga, med mera. De enda exemplen i D2 är inriktade på framställning av olika kompositioner. Sökanden menar därför att D2 inte är relevant vid bedömning av denna uppfinning.

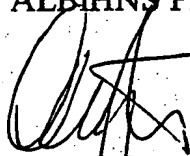
D3 behandlar en löslig kapsel innehållande en suspension av *Lactobacillus*-bakterier avsedda att behandla vaginala infektioner. Inte heller detta dokument redogör för några försök som visar på någon bred inhibering av patogena bakterier, hög överlevnadsförmåga, resistens mot antibiotika eller vidhäftningsförmåga till hud. I likhet med D2 är D3 istället inriktad på olika framställningsförfaranden av själva kapseln. D3 föregriper således inte sökandens uppfinning.

D4 beskriver vaginala suppositorier innehållande skummjolk och *Lactobacillus*-bakterier. Inte heller detta dokument beskriver försök som visar på bred inhibering av patogena bakterier. De försök som beskrivs är kliniska försök och dessa är inte inriktade mot inhibering av många olika bakterietyper, utan bara på patientens allmänna hälsotillstånd. Inget anges heller om överlevnadsförmågan.

Sammanfattningsvis menar sökanden att de anförda mothållen inte innehåller någon beskrivning av någon mikroorganism med lika fördelaktiga egenskaper som sökandens deponerade stam. Sökanden anhåller därför om att ansökan nu godkänns på basis av de gällande patentkraven

Stockholm den 3 september 1999

ALBIHNS PATENTBYRÅ STOCKHOLM AB



Mikael G:son Bergstrand

Bil. Bestyrkt översättning av beskrivning, patentkrav och sammanfattning  
4 Ritningar med bestyrkt svensk översättning  
Deponeringsintyg

## Nytt medel

Denna uppfinning hänför sig till en ny *Lactobacillus*-stam, vilken besitter värdefulla farmakologiska egenskaper. Uppfinningen hänför sig även till farmakologiska kompositioner och produkter för personlig hygien omfattande stammen, såväl som användning av stammen för förebyggande av urogenitala infektioner.

## Teknisk bakgrund

Den vanliga bakteriefloran i det urogenitala området utgörs av ett komplext ekosystem omfattande mer än 50 olika bakteriarter (Hill et al., Scand. J. Urol. Nephrol. 1984; 86 (suppl.):23-29). Den normala floran domineras av bakterier tillhörande släktet *Lactobacillus* (LB) vilka är grampositiva stavar som är anpassade för miljön i vagina hos den fertila kvinnan. Dessa bakterier bidrar även till bibehållandet av den särskilda miljö och den ekologiska balansen i vagina.

Förutom det komplexa interaktionsmönstret hos den mångformiga bakteriefloran i vagina och resten av den urogenitala regionen, är det nödvändigt att överväga variationen av fysiska tillstånd som kan påverka bakteriell tillväxt och vidhäftningsegenskaper. Några LVS-stammar inhiberar tillväxt av potentiellt patogena bakterier genom olika mekanismer. Metabolismen hos LB resulterar i bildandet av organiska syror, framförallt mjölksyra och ättiksyra, vilka bidrar till det låga pH't hos vaginal vätska vilken missgynnar många andra arter. LB kan även producera lösliga substanser som direkt inhiberar tillväxt av potentiellt patogena bakterier och jästsvampar. De kan även framställa väteperoxid vilket är toxiskt för bakterier som saknar enzymet katalas, såsom gramnegativa anaeroba stavar och *Enterobacteriaceae*. Dessa inhiberande egenskaper kan variera väsentligt mellan olika LB-stammar (Hooton et al., JAMA 1990; 265:64-69).

Svaghet hos det naturliga försvarssystemet kan göra det möjligt för potentiellt patogena mikroorganismer att förorsaka kliniska infektioner, exempelvis i samband med

medicinering, försämrad personlig hygien, eller förändringar i hudens mikroflora eller slemhinnor. Den normala floran i vagina domineras av LB och omgivande pH är lägre än 4,5. Jäst och entobakterier har liten förekomst eller saknas (Redondo-Lopez et al., Rev. Inf. Dis. 1987; 12:856-872). Förändringar i den vaginala bakteriefloran kan påträffas i samband med olika patogena tillstånd. Det finns en ökad mängd enterobakterier i vagina och uretralöppningen hos kvinnor som lider av återkommande urinvägsinfektioner och de har även en urogenital flora som i princip saknar laktobaciller (Marrie et al. J. Clin. Microbiol. 1976, 8, 67-72). Det är även känt att infektionsfrekvensen ökar i samband med antibiotikabehandling av andra infektioner (Stamey, Rev. Inf. Dis. 1987;9 (suppl. 2):195-208; Reid et al., Curr. Opin. Inf. Dis. 1991; 4:37-41). Vidare har det visats att barn som tidigare upplevt upprepade antibiotikabehandling är mera benägna att drabbas av urinvägsinfektioner (Mårild et al., Ped. Inf. Dis. 1990; 22:43-47).

I bakteriell vaginos är mängden LB minskad och pH-värdet har ökat. Det finns även en dominans av *Bacterioides*-arter, *Gardnerella vaginalis* och *Mobiluncus* (Redondo-Lopez, *supra*). Vaginit, vilket har samband med en ökad mängd enterobakterier, utgör ofta ett påtagligt problem i samband med antibiotikabehandling. Normal oral administrering av penicillin resulterar i ansamling av substansen i vaginal vätska (Sjöberg et al., Obstet. Gynecol. 1990; 75:18-21) följt av kolonisering av enterobakterier och jäst (Sjöberg et al., Gynecol. Obstet. Invest. 1992; 33:42-46). Undersökningar hos apor (*Macaca fascicularis*) har avslöjat att vaginal administrering av amoxicillin försämrar förmågan hos den normala bakteriefloran att inhibera kolonisering av en patogen bakterie i urinvägsområdet, nämligen *E. coli* (Herthelius et al., Infection 1988; 16:263-266).

Vid graviditet kan kompositionen hos den vaginala floran påverka morbiditeten hos fostret och barnet. Förekomsten av grupp B-streptokocker (GBS) i den fekala och vaginala floran är vanlig (upp till 30% hos alla gravida kvinnor). Dessa bakterier utgör normalt inte något hot mot kvinnans hälsa. Emellertid kan GBS förorsaka allvarliga infektioner hos det nyfödda barnet. I dessa fall överförs bakterier vertikalt

från moder till barn före eller i samband med födelsen. Andra bakterier kan även överföras denna väg och förorsaka infektion hos barnet. Det finns även ett starkt samband mellan bakteriell vaginos och för tidig födsel (Martius et al., Arch. Gynecol. Obstet. 1990; 247:1-13). Mekanismerna bakom detta fenomen är inte kända.

5 Det har visats att en förändring av den vaginala floran mot dominans av gramnegativa arter ökar mängden av enzymet fosfolipas A2, vilket i sin tur kan initiera prostaglandinsyntes med utgångspunkt från arakidonsyra (Bejar et al., Obstet. Gynecol. 1981; 57:479-482). Vaginosfloran producerar även stora mängder endotoxin (Sjöberg et al., Obstet. Gynecol. 1991; 77:265-266) vilket kan framkalla endogen prostaglandinsyntes (Romero et al., Obstet. Gynecol. 1989; 73:31-34), möjligen under  
10 påverkan av interleukiner.

De teoretiskt positiva egenskaperna hos LB har motiverat deras användning i kommersiella preparationer med den avsedda användningen att komplettera och stärka  
15 den vaginala floran. Framgången har varierat och ofta innehåller de tillgängliga preparationerna väsentligen lägre mängder LB än vad som angetts. Några preparationer har även kontaminerats (Hughes et al., Obstet. Gynecol., 1990; 75(2):244-248). För att komplementera och förbättra den normala bakteriefloran i den urogenitala regionen genom tillsats av LB, är det nödvändigt att noga välja de bakteriestammar som  
20 skall användas. En LB-stam som lämpar sig för detta ändamål bör uppfylla följande kriterier:

1. LB-stammen bör producera stora mängder lösliga substanser med tillväxtinhiberande förmåga på enterobakterier, grupp B-streptokocker, stafylokocker och jästsvampar.  
25
2. LB-stammen bör ha förmåga att överföras till huden och slemhinneytor i den urogenitala regionen.
3. LB-stammen bör ha förmåga att vidhäfta till epitelytor i den urogenitala regionen.
4. LB-stammen bör ha förmåga att uthärda lagring under en lång tidsperiod, och det  
30 måste vara möjligt att införa stammen i olika slags preparationer.



5. LB-stammen bör ha förmåga att bibehålla sin viabilitet och sina egenskaper i en artikel eller preparation vid användning.
6. LB-stammen bör inte vara känslig för spermacidala preparationer innehållande nonoxynol-9.
- 5 7. LB-stammen bör isoleras från den urogenitala regionen hos kvinnan.
8. LB-stammen bör möjliggöra existens av den humana urogenitala LB-floran.

Följaktligen, finns det ett behov av stammar som uppfyller dessa krav.

## 10 Sammandrag av uppfinningen

En ny stam av *Lactobacillus plantarum*, benämnd LB931, har isolerats, och denna uppfyller de krav som räknats upp ovan. Stammen har deponerats vid Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, DE. Den har tilldelats registreringsnummer DSM11918. Följaktligen kan LB931 användas för att behandla och/eller förebygga urogenitala infektioner. LB931 kan med fördel ingå i farmakologiska kompositioner och i produkter för personlig hygien, såsom blöjor och bindor.

## 20 Definitioner

Den här använda termen "LB" hänför sig till bakterier av släktet *Lactobacillus*.

Den här använda termen "urogenital region" hänför sig till perineum, urinröret och vagina.

Den här använda termen "absorberande artikel" hänför sig till produkter som lämpar sig för absorption av en kroppsvätska, såsom blod eller urin. Exempel på sådana artiklar är hygienprodukter för kvinnor, inkontinensskydd, och blöjor.

Den här använda termen "GBS" hänför sig till grupp B-streptokocker.

Den här använda termen "mjölksyrabakterier" hänför sig till bakterier som framställer mjölksyra, såsom bakterier tillhörande släktena *Lactobacillus* och *Lactococcus*.

5

Den här använda termen "cfu" hänför sig till kolonibildande enheter.

#### Detaljerad beskrivning av uppfinningen

10 Denna uppfinning hänför sig till en ny stam av *Lactobacillus plantarum*, benämnd LB931 (DSM11918). Denna bakteriestam är värdefull i samband med förebyggande och/eller behandling av urogenitala infektioner då den inhiberar tillväxt för ett stort antal patogena mikroorganismer. Stammen är uthållig och överlever enkelt långa pe-  
 15 rioder av lagring vid rumstemperatur. Följaktligen har produkter innehållande LB931 en lång hållbarhetstid. Stammen kan enkelt överföras till mänsklig hud och vaginalt epitel. LB931 är motståndskraftigt mot terapeutiska koncentrationer av några antibiotiska substanser och spermacidala föreningar.

20 Inhibitionsegenskapen hos LB931 har undersökts. Exempel på bakteriearter som framgångsrikt inhiberas är *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Staphylococcus* och *Streptococcus* från grupp B. LB931 är således användbar för att förebygga och/eller behandla infektioner som förorsakas av dessa mikroorganismer.

25 Som noterats ovan tillhandahåller denna uppfinning även ett antal farmakologiska kompositioner, som företrädesvis lämpar sig för topisk administrering, och som innehåller LB931 tillsammans med farmakologiskt eller fysiologiskt godtagbara bärare, fyllmedel och/eller utspädningsmedel. I allmänhet bör sådana bärare vara icke-toxiska för mottagarna med utnyttjade doseringsnivåer och koncentrationer. Normalt omfattar framställning av sådana kompositioner kombination av det terapeutiska  
 30 medlet med buffertsubstanser, förtjockningsmedel eller gelbildande medel såsom glycerin, polyetylglykol, etc. Antioxidanter såsom askorbinsyra, polypeptider med

låg molekylvikt (mindre än omkring 10 aminosyrarester), proteiner, kolhydrater inklusive glukos, sukros och dextriner, och andra stabiliseringsmedel och fyllmedel kan ingå. Möjliga farmakologiska kompositioner är salvor, krämer, flytande lösningar, stolpiller eller kapslar.

5

Denna uppfinning hänför sig även till absorberande artiklar innehållande LB931. En sådan artikel kan innefatta ett permeabelt yttre skikt vilket är avsett att stå i nära kontakt med bärarens hud, ett företrädesvis vätskeogenomträngligt bakre skikt vilket är avsett att ligga distalt från bäraren vid användning, och en absorberande struktur som placerats mellan det yttre skiktet och det bakre skiktet. I en del fall kan ytterligare ett skikt i form av exempelvis vadd eller liknande material placeras mellan det yttre skiktet och den absorberande strukturen. De mikroorganismer som uppvisar antagonistiska egenskaper kan placeras i olika delar av den absorberande artikeln, exempelvis i det yttre skiktet, i den absorberande strukturen hos den absorberande artikeln, mellan två av skikten i den absorberande artikeln, i en separat insättningsprodukt i den absorberande artikeln, eller på något annat sätt.

10

15

Denna uppfinning kommer nu att beskrivas med hänvisning till bifogade figurer i vilka:

20

Fig. 1 är ett diagram som visar stabiliteten hos frystorkad LB931 vid rumstemperatur (+22°C) och vid +6°C;

25

Fig. 2 är ett diagram som visar stabiliteten hos LB931 som impregnerats i en absorberande artikel;

Fig. 3 och 4 avslöjar mängden LB931 som överförs till urinrörsöppningen och huden i perineum hos unga flickor efter att ha använt ett trosskydd innehållande LB931.

30

Denna uppfinning kommer nu att beskrivas med hänvisning till följande exempel.

Exempel 1: Isolering och typbestämning av *Lactobacillus plantarum*, stam LB931

- 5 Bakterierprover togs från friska kvinnor. Från dessa prover isolerades bakteriestammar och dessa stammar sållades med hänsyn till deras förmåga att inhibera tillväxt av enterobakterier (data visas inte). Den bästa stammen, vilken isolerats från en frisk gravid kvinna, klassificerades som *Lactobacillus plantarum* enligt testsatsen API 50 CH (API systems, BioMerieux, FR), och benämndes LB931. Stammen typbestämdes vidare genom DNA-analys med SDS-page vid BCCM/LMG (Belgien) att  
10 vara *Lactobacillus plantarum-pentosus-paraplantarum*.

Exempel 2: Inhiberingskapacitet hos stam LB931

- 15 Ändamålet med detta experiment var att illustrera förmågan hos stam LB931 att inhibera tillväxt av andra bakterier. LB931 odlades i MRS-buljong (Merck, DE) vid en temperatur av 37°C i 5% CO<sub>2</sub> över natten. 1 ml, vilken innehöll 10<sup>8</sup> bakterier, sattes till 25 ml smält 2% agar i MRS-buljong. Blandningen hälldes i Petri-skålen, och tilläts bilda gel och inkuberades såsom beskrivits ovan under 24 timmar. En annan portion på 25 ml M17-agar (Merck, DE) hälldes ovanpå det första skiktet och  
20 plattorna fick stå vid rumstemperatur under 4 timmar. Liknande agarplattor utan LB931 framställdes också och användes som kontrollplattor.

- Indikatorbakterien odlades separat i TY-medium (Holm et al., APMIS 1967; 69, 264) vid 37°C i luft. Odlingarna överfördes till en Bertani-bricka med 25 rum, där  
25 varje rum innehöll 0,25 ml (10<sup>6</sup> bakterier/ml). Från var och en av dessa brickor överfördes bakterierna och stämplades på agarplattorna innehållande lactobacillerna, genom att använda Steers stål nålsreplikator (Steers et al., J. Antibiot. Chemother. 1979, 9, 307). Plattorna inkuberades vid 37°C över natten. Plattorna avlästes och det  
30 fastställes huruvida a) indikatorbakterierna hade växt; b) tillväxten hos indikator-

bakterierna hade inhiberats; eller c) ingen tillväxt av indikatorbakterierna hade skett. pH hos var och en av plattorna följdes också.

Resultaten av interferenstesterna visas i Tabell I.

5

Tabell I

Art av indikatorbakterie	Inhibering	
	%	Ingen/total
Koagulasnegativa stafylokocker	90	9/10
Streptococcus typ B	100	19/19
Lactobacillus sp.	7	1/14
Klebsiella sp.	100	50/50
E. coli	100	50/50
Proteus sp.	100	50/50

Resultaten visar att *Lactobacillus plantarum*, LB931 inhiberar eller förhindrar tillväxt av ett stort antal bakteriestammar, och att andra *Lactobacillus*-stammar för det mesta är opåverkade.

10

Exempel 3: Överlevnadsförmågan hos LB931 i olika preparationer:

15

a) LB931 löst i en suspension av lika delar skummjolk och 0,9% NaCl

LB931 löstes i skummjolk innehållande 0,9% NaCl. De lösta bakterierna inkuberades därefter vid olika temperaturer. Mängden bakterier följdes kontinuerligt genom cellräkning. Resultaten avslöjas i Tabell II nedan.

	Antal bakterier (CFU)			
Temperatur (°C)	Dag 0	Dag 2	Dag 5	Dag 32
4	$7,8 \times 10^{10}$			$2,2 \times 10^{10}$
20	$1,8 \times 10^{10}$		$2,2 \times 10^{10}$	
27	$1,8 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^9$	
37	$1,8 \times 10^{10}$	$5,8 \times 10^9$	$1,0 \times 10^5$	

Resultaten visar att LB931 är stabil i en blandning av skummjolk och NaCl under en tidsperiod av 1 månad vid +4°C.

5

b) En skummjölkspreparation av LB931 frystorkades enligt standardförfaranden. Det erhållna pulvret lagrades i Petri-skålar vid rumstemperatur och vid 6°C. Antalet bakterier bestämdes efter 7 dygn resp. 25 dygn. Resultaten avslöjas i Tabell III nedan.

10

Tabell III

	Antal bakterier (CFU)		
Temperatur (°C)	Dag 0	Dag 7	Dag 25
6	$4,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
22	$4,2 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$

Antal bakterier i det frystorkade pulvret mättes även var 4:e vecka upp till 68 veckor. Dessa resultat visas i Fig. 1. Det visas tydligt i figuren att LB931 är stabil vid både rumstemperatur och +6°C under 22 veckor. Efter 1 år vid +6°C är mer än  $10^5$  cfu/mg LB931 fortfarande livskraftiga.

15

c) Förmågan hos LB931 att överleva i syntetisk urin, pH 6,6, undersöktes. Den syntetiska urinen innehåller mono-, en divalent katjon och anjoner såväl som urea och framställes enligt anvisningar i Geigy, Scientific Tables, Vol. 2, 8:e uppl. 1981 sid. 53. Till den sterila syntetiska urinen sattes näringsmedium för mikroorganismer.

5 Näringsmediumet framställdes enligt data från sammansättning av familjerna Hook och FSA. Till 1 ml syntetisk urin sattes  $10^3$  LB931-bakterier, och proverna inkubades under 18 timmar vid  $32^\circ\text{C}$ . Efter inkubationen uppgick antalet bakterier i provet till mer än  $10^5/\text{ml}$ . LB931 har förmåga att överleva och växa i syntetisk urin.

10 d) Förmågan hos LB931 att överleva i en absorberande artikel (trosskydd) undersöktes. En suspension av LB931 ( $150\ \mu\text{l}$ ) sattes till den absorberande artikeln och denna artikel lagrades därefter i en tät förpackning upp till 9 månader. Resultaten visas i Fig. 2. Ett stort antal bakterier överlevde under 7 månader.

15 e) Slutligen undersöktes LB931 med avseende på sina egenskaper under en tids odling och lagring. LB931 odlades i MRS-buljong och en ny passage gjordes var tredje dag under 3 månader. Efter detta jämfördes startprovet av LB931 och den sista passagen i API-testet, PGFE och interferenstestet. De två proverna var identiska i alla testerna. Det är visat att LB931 är mycket stabil efter lagring och flera passager i

20 odlingsmedium.

#### Exempel 4: Överföring av LB931 till hud i perineum och urinrörsöppningen hos kvinnor

25 För att undersöka överföring av LB931 till perineum vid användning av ett trosskydd utfördes följande undersökning. Alla testpersoner var kvinnor i en ålder mellan 12 och 60 år, och testerna utfördes mellan menstruationsperioder då så var lämpligt. Testprodukterna framställdes med utgångspunkt från konventionella trosskydd omfattande ett vätskepermeabelt ytterskikt, ett vätsketätt bakre skikt och mellan dessa

30 ett absorberande skikt med  $100\text{-}200\ \text{g/m}^2$  kemisk cellulosamassa. På den absorbe-

rande sidan av testprodukten sprejades en suspension av LB931-bakterier i en mängd av  $10^9$  koloniformande enheter per produkt.

För att bestämma närvaron av LB931 i perineum hos de 13 försökspersonerna utfördes ett s k svabbtest. Bakterier samlades upp genom att gnida en steril sticka omfattande en bomullstopp som nedsänkts i steril natriumkloridlösning på en definierad hudyta. Förekomsten av LB931 och andra LB på huden i perineum och vid urinöppningen bestämdes. Försökspersonerna bestämdes på detta sätt för att fastställa ett nollprov. Därefter bar försökspersonerna trosskydd under 5 timmar på morgonen. Trosskyddet avlägsnades och förekomsten av tillsatta mjölksyrabakterier resp. naturliga mjölksyrabakterier bestämdes på nytt, direkt efter det att trosskyddet avlägsnats. Detta prov benämndes som prov 1. Efter 4-5 ytterligare timmar togs ytterligare ett prov, och detta benämndes som prov 2. Mjölksyrabakterietypen identifierades genom att använda Rogosa-agar med vancomycin vad gäller LB931 och Rogosa-agarplattor inkuberades anaerobt vad gäller andra LB. Ytterligare identifiering utfördes genom API (BioMerieux, FR) och PFGE (elektrofores med pulsfält). Resultaten visas i Tabell IV. LB931 kunde påträffas på huden i perineum eller vid urinrörsöppningen hos alla kvinnor efter användning av ett trosskydd som sprejats med LB931.



Person nr.	TABELL IV	Prov 1		Prov 2	
		Urinrörsöppningen	Hud i perineum	Urinrörsöppningen	Hud i perineum
1	LB931 Endogen LB flora	$2 \times 10^2$ 0	$4 \times 10^4$ 0	0 0	0 0
2	LB931 Endogen LB flora	$6 \times 10^1$ 0	$7 \times 10^3$ 0	0 0	$2 \times 10^2$ 0
3	LB931 Endogen LB flora	$1 \times 10^3$ 0	$1 \times 10^2$ 0	$1 \times 10^1$ 0	$5 \times 10^1$ 0
4	LB931 Endogen LB flora	$1 \times 10^2$ +	$3 \times 10^2$ +	$3 \times 10^1$ +	$1 \times 10^3$ +
5	LB931 Endogen LB flora	$2 \times 10^3$ +	$3 \times 10^3$ 0	$2 \times 10^1$ +	$1 \times 10^1$ +
6	LB931 Endogen LB flora	$1 \times 10^2$ +	$2 \times 10^2$ +	$1 \times 10^1$ +	$7 \times 10^1$ +
7	LB931 Endogen LB flora	$2 \times 10^3$ +	$8 \times 10^3$ +	$1 \times 10^2$ +	$7 \times 10^1$ +
8	LB931 Endogen LB flora	$2 \times 10^1$ 0	$4 \times 10^3$ 0	0 0	$8 \times 10^1$ 0
9	LB931 Endogen LB flora	$9 \times 10^1$ +	$2 \times 10^2$ +	0 +	$8 \times 10^1$ +
10	LB931 Endogen LB flora	$3 \times 10^3$ 0	$2 \times 10^4$ 0	$7 \times 10^2$ 0	$4 \times 10^3$ 0
11	LB931 Endogen LB flora	$2 \times 10^2$ +	$6 \times 10^2$ +	$3 \times 10^2$ +	$2 \times 10^2$ +
12	LB931 Endogen LB flora	$7 \times 10^1$ 0	$9 \times 10^2$ 0	0 0	$1 \times 10^1$ 0
13	LB931 Endogen LB flora	$5 \times 10^3$ 0	$7 \times 10^3$ 0	$7 \times 10^2$ 0	$7 \times 10^1$ 0
Antalet LB931-positiva:		13	13	8	12

### Exempel 5: Överföring av LB931 till huden i perineum och urinrörsöppningen hos flickor

13 unga flickor i en ålder av från 3 till 12 år ingick i studien. Bakterieprover från huden i perineum och urinrörsöppningen erhöles genom att först nedsänka en bomullstopp i MRS-buljong, och därefter försiktigt gnida toppen på huden eller epitelytan. Slutligen nedsänktes toppen i ett provrör innehållande MRS-buljong. Prover erhöles enligt följande schema:

- 10 Prov 0: Ett nollprov erhöles kvällen före studiens inledning och detta omfattade en LB931-bakterie. På kvällen dag 1 sattes ett trosskydd på.
- Prov 1: Morgonen dag 2. Ett nytt trosskydd bärs under dagen.
- Prov 2: Ett prov togs på kvällen före ett frivilligt bad och innan ett nytt trosskydd togs på. Kvällen, dag 2.
- 15 Prov 3: Samma förfarande som för prov 1. Morgonen, dag 3.
- Prov 4: Samma förfarande som för prov 2. Kvällen, dag 3.
- Prov 5: Samma förfarande som för prov 1. Morgonen, dag 4.
- Prov 6: Ett prov tas kvällen före ett eventuellt bad. Inget trosskydd bärs under natten. Kvällen, dag 4.
- 20 Prov 7: Ett prov tas på morgonen dag 5. Inget trosskydd bärs under dagen.
- Prov 8: Det sista provet tas på kvällen dag 5.

Resultaten presenteras i Fig. 3 (urinrörsöppning) och Fig. 4 (huden i perineum). Resultaten visar att LB931 kan överföras från en absorberande artikel.

### Exempel 6: Känslighet för antibiotikasubstanter och spermacidala medel

MIC-värden för *Lactobacillus plantarum* LB931 bestämdes genom att använda E-testet (Brown et al. J. Antimicrob. Chemother. 1991; 27:185-190). Resultaten avslöjas i Tabell V nedan.

Tabell V

	Antibiotikasubstans	MIC µg/ml
	Ampicillin	0,19
5	Cefotaxim	0,094
	Cefuroxim	0,38
	Gentamycin	0,25
	Imipenem	0,016
	Metronidazol	> 32
10	Erytromycin	0,25
	Vancomycin	> 256
	Piperazin/Tazobactam	2
	Tetracyklin	2
	Trimetoprim	0,016
15	Bensylpenicillin	0,5

Känsligheten för antibiotikasubstanser bestämdes även genom att utnyttja SIR-systemet. I Tabell VI nedan betyder S känslig och R resistent.

20 Tabell VI

Antibiotikasubstans	Zon (mm)	Indikation
Cefadroxil	24	S
Clindamycin	35	S
Tri/sulfametoazol	43	S
Ceftazidim	35	S
Amikacin	30	S
Aztreonam	0	R
Mecillinam	0	R

Nalidixinsyra	0	R
Netilmycin	0	R
Nitrofuantin	36	S
Norfloxacin	0	R
Tobramycin	32	S
Mecillinam/Ampicillin	41	S
Cefipirome	47	S
Oxacillin	0	R
Cefalotin	22	S

LB931 är känsligt för några antibiotikasubstanter som vanligen föreskrivs i samband med urinvägsinfektioner men LB931 är även resistent mot exempelvis nalidixinsyra och norfloxacin. LB931 är även resistent mot vancomycin.

5

MIC-tester utfördes också för det spermacidala medlet Tergitol. LB931 odlades på MRS-agar i 5% CO<sub>2</sub>, 37°C under 48 timmar. Bakterierna ympades i 3 ml MRS-buljong och inkuberades under 10 timmar under samma förhållanden som tidigare angetts. 1,5% av odlingen återympades till 3 ml MRS-buljong och inkuberades under samma förhållanden under 18 timmar. NP-9-Tergitol (Sigma, USA) sats 47F0002 späddes i MRS-buljong med en temperatur på 37°C (reducerad viskositet) till en lagerlösning på 40%. Genom att använda denna lagerlösning framställdes 3 ml lösningar med följande koncentrationer: 0%, 5%, 10%, 20%, 30% och 40%.

10

10 µl bakterieodling sattes till varje lösning. Nolllösningen blandades och sattes till MRS-agarplattor. Plattorna odlades i 5% CO<sub>2</sub>, 37°C under 48 timmar för att bestämma celltätheten. Resten av lösningarna inkuberades utan omblandning i 5% CO<sub>2</sub>, 37°C under 18 timmar. Lösningen innehållande 30% och 40% NP-9 späddes i 37°C MRS-buljong (reducerad viskositet). Alla lösningarna omblandades kraftigt, späddes i steril 0,9% NaCl och sattes till MRS-agarplattor. Plattorna inkuberades i 5% CO<sub>2</sub>, 37°C under 48 timmar för att bestämma cfu/ml.

20

Resultaten avslöjas i Tabell VII nedan.

Ympad mängd LB931 var  $1,0 \times 10^7$  cfu

	Tergitol NP-9	Cfu/ml LB931
5	0%	$2,6 \times 10^9$
	1%	$2,5 \times 10^9$
	5%	$2,5 \times 10^9$
	10%	$1,6 \times 10^9$
	20%	$1,4 \times 10^9$
10	30%	$1,0 \times 10^9$
	40%	$6,9 \times 10^7$

Resultaten visar att LB931 väl klarar av att överleva i 40% Tergitol NP-9.

#### 15 Exempel 7: Vidhäftning av LB931 till vaginala epitelceller

##### a) Framställning av en suspension av LB931

LB931 odlades på MRS-agar (5% CO<sub>2</sub>, 37°C; 48 timmar). Odlingen ympades till  
 20 3 ml buljong (5% CO<sub>2</sub>; 37°C; 8 timmar). 2% av den resulterande odlingen återym-  
 pades till 10 ml MRS-buljong (5% CO<sub>2</sub>; 37°C; 18 timmar). Den resulterande od-  
 lingen centrifugerades under 8 minuter vid 20°C och vid 2 000 vpm i en utsväng-  
 ningsrotor (820 x g). Den erhållna cellkakan tvättades i 5 ml mjölksyrabuffert  
 (10 mM mjölksyra, pH 4,5, 0,15 M NaCl). Bakterierna späds i mjölksyrabuffert till  
 25 dess OD<sub>500</sub> ligger på omkring 1,0 (omkring  $10^8$  cfu/ml).

## b) Framställning av vaginala epitelceller

Vaginala epitelceller skördades genom att använda en steril bomullspinne, och cellerna överfördes till 4 ml mjölksyrabuffert eller PBS i ett litet rör. Röret blandades och bomullspinnen avlägsnades. Röret centrifugerades vid 700 vpm och 20°C under 8 minuter i en Jouan CR.-12 utsvängningsrotor (ungefär 100 x g), och de erhållna cellkakorna tvättades i 3 ml mjölksyrabuffert eller PBS. Cellerna räknades i en hematocytometer och koncentrationen justerades till  $10^5$  till  $10^6$  celler/ml genom att utnyttja mjölksyrabuffert eller PBS. 25 µl celler spreds ut på ett mikroskoptäckt glas för att kontrollera tvätförfarandet (se nedan).

## c) Vidhäftningstester

0,5 ml LB931-suspension och 0,5 ml cellsuspension blandades snabbt i ett 1,5 ml Eppendorf-rör. Ett kontrollprov preparerades genom att blanda 0,5 ml cellsuspension och 0,5 ml buffert. Rören centrifugerades vid 20°C och 2 000 vpm ( $\approx 720 \times g$ ), och inkuberades därefter under 1 timme vid 37°C. Efter inkubationstiden centrifugerades rören under 8 minuter vid 20°C och 700 vpm ( $\approx 90 \times g$ ). Cellkakorna tvättades i 1 ml mjölksyrabuffert eller PBS. Slutligen suspenderades cellkakorna i 400-500 µl mjölksyrabuffert eller PBS.

## d) Analys

25 µl av en suspenderad cellkaka tilläts lufttorka på ett mikroskoptäckt glas, följt av fixering och gramfärgning. I varje prov analyserades 50 epitelceller. Antalet LB931 som vidhäftat till cellerna räknas och resultaten delas in i fem grupper (0-10, 11-30, 31-50, 51-100, > 100 bakterier/cell).

Resultaten avslöjas i Tabell VIII nedan:

## Tabell VIII

Antal försökspersoner: 5

Provtagningsstillfällen: före menstruation (bm); ägglossning (ov)

5

Epitelceller prover	Vidhäftade LB931/epitelcell				
	0-10	11-30	31-50	51-100	> 100
(bm) inkuberad med LB931, pH 4,5	17,2*	24,8	14,4	15,6	28,0
(bm) inkuberade med kontrollceller, pH 4,5	99,6	0,4			
(ov) inkuberade med LB931, pH 4,5	8,4	22,8	19,2	20,0	29,6
(ov) inkuberade med kontrollceller, pH 4,5	98,4	1,6			

\* siffror anges i procent

Resultaten visar tydligt att LB931-bakterier vidhäftar väl till vaginala epitelceller oberoende av när cellproverna tas.

Patentkrav

1. *Lactobacillus plantarum*, stam LB931, vilken deponerats vid Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, och tilldelats registreringsnummer DSM11918.

5

2. *Lactobacillus plantarum*, stam LB931, vilken deponerats vid Deutsche Sammlung von Mikroorganismen och tilldelats registreringsnummer DSM11918, för medicinsk användning.

10

3. Farmakologisk komposition innehållande *Lactobacillus plantarum*, stam LB931, vilken deponerats vid Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, och tilldelats registreringsnummer DSM11918, tillsammans med en farmakologiskt godtagbar bärare och/eller fyllmedel.

15

4. Farmakologisk komposition enligt krav 3, kännetecknad av att den även innehåller andra mjölksyrabakterier.

5. Farmakologisk komposition enligt krav 3 innehållande  $10^4$  till  $10^{11}$  cfu, företrädesvis  $10^5$  till  $10^9$ , cfu LB931.

20

6. Farmakologisk komposition enligt krav 3 vilken är en suspension, sprej, gel, kräm, pulver, kapsel eller ett vaginalinlägg.

25

7. Absorberande produkt, såsom en produkt för kvinnlig hygien, blöja, binda, trosskydd eller inkontinensskydd, kännetecknad av att det innehåller *Lactobacillus plantarum*, stam LB931, vilken deponerats vid Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, och tilldelats registreringsnummer DSM11918.

30

8. Absorberande produkt enligt krav 7 innehållande  $10^4$  till  $10^{11}$  cfu, företrädesvis  $10^5$  till  $10^9$  cfu, LB931.



9. Farmakologisk komposition enligt krav 5 där nämnda farmakologiskt godtagbara bärare är skummjölk eller en tillväxtfaktor för *Lactobacillus* i pulverform eller någon annan form.

5 10. Användning av *Lactobacillus plantarum*, stam LB931, vilken deponerats vid Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, och tilldelats registreringsnummer DSM11918, för att framställa en farmakologisk komposition för att förhindra och/eller behandla urogenitala infektioner, såsom kolonisering av enterobakterier.

10 11. Användning av *Lactobacillus plantarum*, stam LB931, vilken deponerats vid Deutsche Sammlung von Mikroorganismen och tilldelats registreringsnummer DSM11918, för framställning av en absorberande artikel, såsom en blöja, binda, trosskydd eller ett inkontinensskydd, som lämpar sig för att förebygga och/eller behandla urogenitala infektioner, såsom kolonisering av enterobakterier.

### Sammandrag

En ny stam av *Lactobacillus plantarum*, benämnd LB931, har nu isolerats. Stammen har deponerats vid Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, DE. Den har tilldelats registreringsnummer DSM11918. Följaktligen kan LB931 användas för att behandla och/eller behandla urogenitala infektioner. LB931 kan med fördel ingå i farmakologiska kompositioner och i produkter för personlig hygien, såsom hygienprodukter avsedda för kvinnor, blöjor och bindor.

Fig. 1

# Stabilitetstest, LB931 (frystorkad)

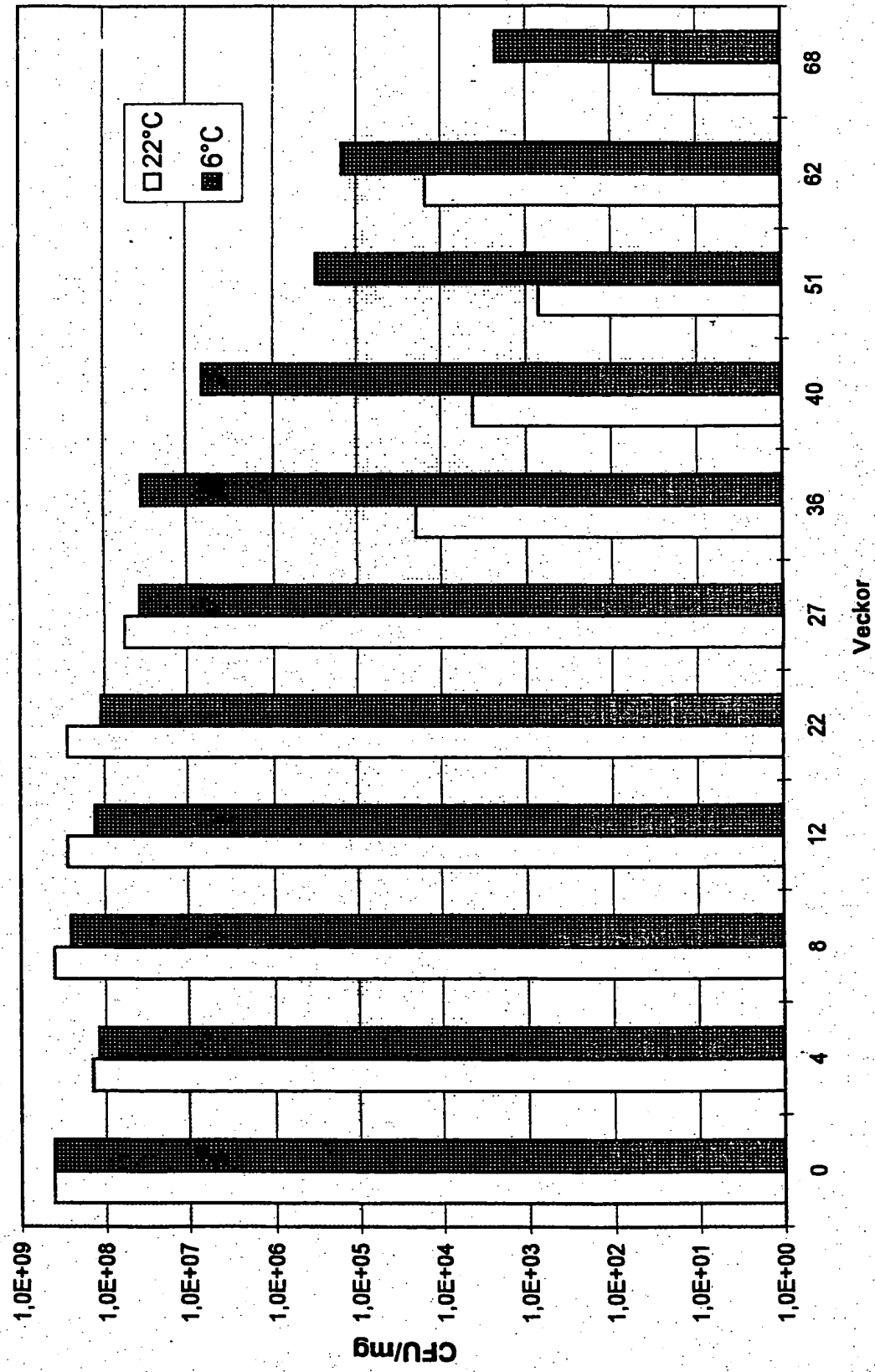
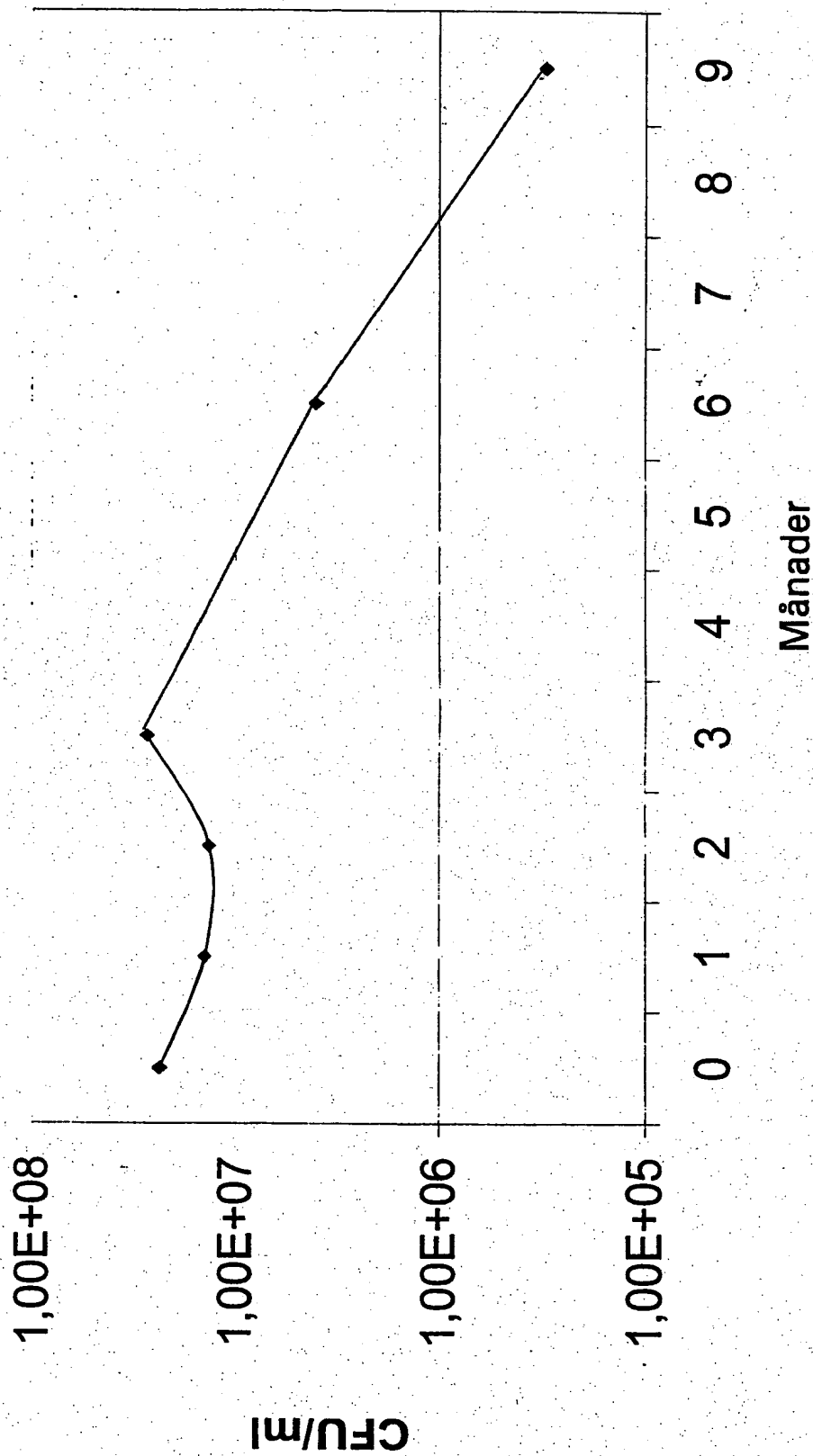


Fig 2

Stabilitet hos LB931 impregnerad i en absorberande artikel,  
"Soft Normal"



Medelvärde av LB931 under perioden dag/natt (urinrör)

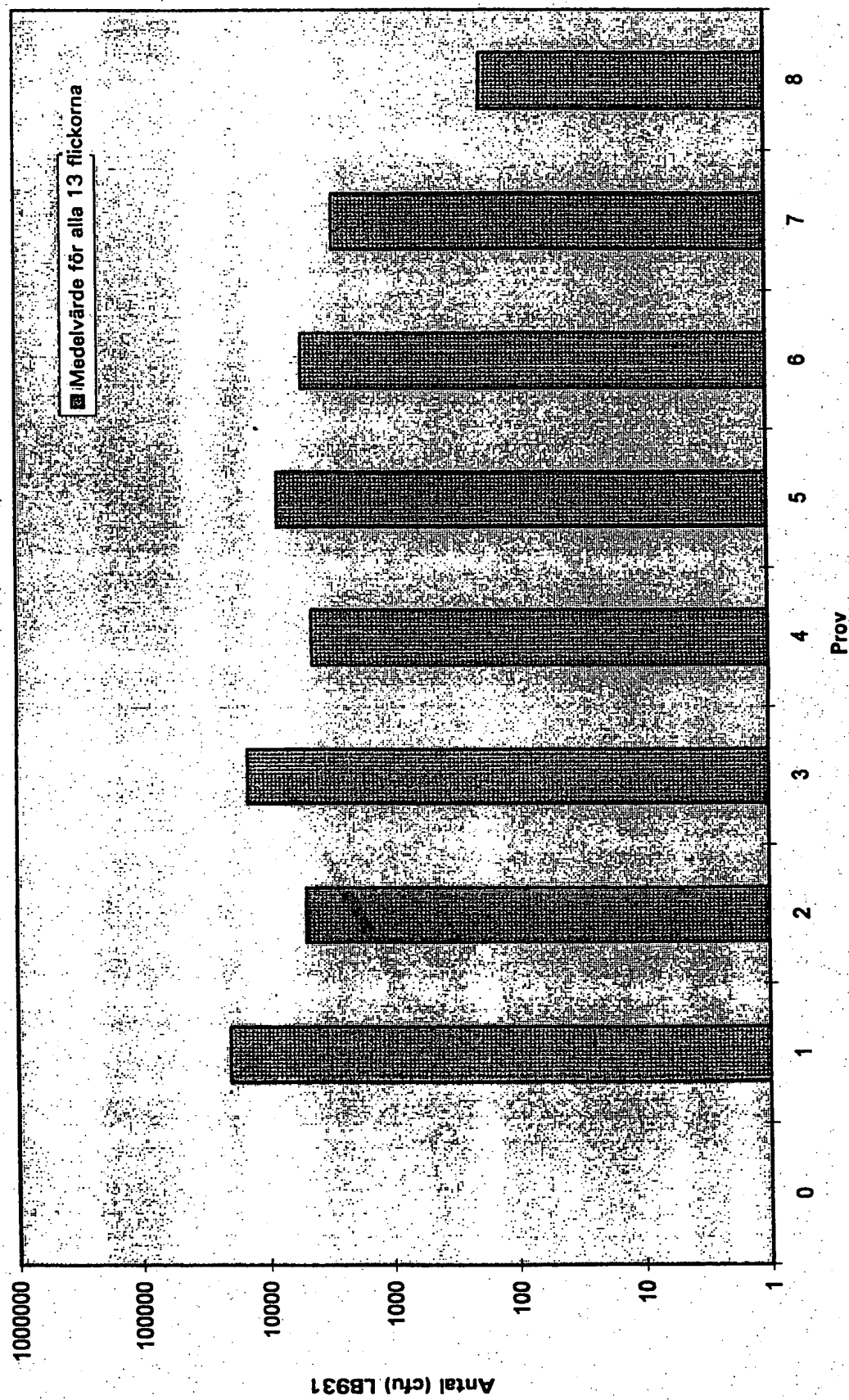


Fig. 4

Medelvärde av LB931 under perioden dag/natt (perineum)

